

ゲラニルゲラニオール由来代謝物の同定とその機能に関する研究

著者	小平 裕一
号	47
学位授与番号	2098
URL	http://hdl.handle.net/10097/39132

氏名・(本籍)

こ だいら ゆう いち
小 平 裕 一

学位の種類

博士(理学)

学位記番号

理博第2098号

学位授与年月日

平成16年3月25日

学位授与の要件

学位規則第4条第1項該当

研究科, 専攻

東北大学大学院理学研究科(博士課程)化学専攻

学位論文題目

ゲラニルゲラニオール由来代謝物の同定とその機能に関する研究

論文審査委員

(主査) 教授 古 山 種 俊

教授 十 川 和 博, 齋 藤 正 男

助教授 佐 上 博

論 文 目 次

序

第1章 ゲラニルゲラニオール由来代謝物の解析

第1節 イソプレノイド化合物の合成

第2節 ゲラニルゲラニオール由来代謝物の解析

第3節 ゲラニルゲラニオール由来代謝物の同定と
GGOH由来代謝物の解析

第2章 (R)-2,3-ジヒドロゲラニルゲラノイン酸の機能解析

第1節 胸腺細胞でのアポトーシス誘導

第2節 CRABPに対する結合活性

第3節 HL-60を用いた分化誘導能の解析

第4節 顆粒の生成とその組成の解析

第5節 脂肪前駆細胞を用いた分化誘導能の解析

第6節 PPAR γ に対する結合活性

総括

参考文献

謝辞

論 文 内 容 要 旨

序

イソプレノイド化合物は、イソプレンを基本骨格とした有機化合物の総称であり、高等動物については、Cholesterol, Dolichol, Ubiquinoneや短鎖長イソプレノイドが直接タンパク質に結合したプレニル化タンパク質などの代謝物が挙げられる。これらイソプレノイド化合物は、まずDMAPPをプライマー基質として、1分子のIsopentenyl Diphosphate (IPP) が縮合し、炭素鎖長C₁₀のGeranyl Diphosphate (GPP) が合成され、この

GPPにもう1分子もしくは、2分子のIPPが縮合することで、炭素鎖長 C_{15} のFarnesyl Diphosphate (FPP)、炭素鎖長 C_{20} のGeranylgeranyl Diphosphate (GGPP) が合成される。この基本的な鎖延長反応によって合成されたFPPあるいは、GGPPを中間体とし、それに引き続く環化、転位などの修飾を経て生合成される。FPPは数多くのイソプレノイド派生化合物の生合成に至る共通の前駆物質となっている。一方、GGPPは、ゲラニルゲラニル化タンパク質の生合成の前駆物質として存在し、低分子量Gタンパク質を修飾し、膜へ局在させる働きを持つ。

FPPやGGPPからの機能分子への生合成系の研究に対して、異化代謝系の研究は遅れている。FPPに関しては、メバロン酸代謝物として ω 酸化されたDicarboxylic Acidが同定されている。一方、GGPP に関しては、メバロン酸由来代謝物として*E,E,E*-Geranylgeranoic Acid (GGA) 及び、Internal-*cis*-GGA の存在が報告されているが、クロマトグラフィーによる挙動から推測しているため、その構造は未知である。

これらGGPPからの異化代謝化合物は、薬理的な側面から精力的な研究が行われている。Geranylgeraniol (GGOH) は白血病細胞であるHL-60にアポトーシスを誘導する。同様に、*E,E,E*-GGAや4,5-didehydroGGAは、肝癌細胞HuH-7にアポトーシスを誘導するが、正常肝細胞にはアポトーシスを誘導しない。そのため抗がん剤として有力な化合物であり、特に4,5-didehydroGGAは肝癌再発防止薬として臨床試験が行われている。

当研究室では、癌細胞ではないが正常細胞である胸腺細胞を用いて種々のイソプレノイド化合物によるアポトーシス誘導の研究が行われており、これまでにGGOH, Geranylgeranial, GGAによる低濃度でのアポトーシス誘導がおこることを明らかにしている。更に、筆者はGeranylgeranialによるアポトーシス誘導機構を明らかにするために、Geranylgeranialを用いてアポトーシス誘導、非誘導での代謝物の解析を行ってみた。そして、アポトーシス非誘導細胞において、未知カルボン酸代謝物の存在を明らかにした。

このように、癌細胞に対して興味深い作用を示すGGOH, GGA, 4,5-didehydroGGAに加え、胸腺細胞において代謝される未知カルボン酸代謝物は、高等動物においてメバロン酸から生合成されるGGPPの異化代謝物である一方で、生理活性物質として機能する可能性も考えられる。そこで、本研究では興味深い作用を持つGGA類似化合物の生体内での存在を明らかにするため、GGOH由来代謝物の解析と生理的機能の解析を行った。

第1章 ゲラニルゲラニオール (GGOH) 由来代謝物の解析

[方法] $[^{14}C]$ GGOH及び $[^{14}C]$ Geranylgeranialをラット胸腺細胞を含むRPMI1640培地にて一定時間培養し、Bligh-Dyer法により脂質を抽出後、代謝物の解析をTLC, HPLCを用いて解析した。また、構造解析、絶対配置の決定にはそれぞれEI-MS, Diastereomer法を用いた。

[結果]主代謝物として2種類のカルボン酸化合物 (Z1, Z2) を検出した。Z1は、Z2の前駆体であり、その構造は、HPLCによる解析から、*E,E,E*-GGAであった。また、代謝物Z2は、胸腺細胞において最終代謝物であることを確認した。この未知代謝物Z2については、EI-MS及びDiastereomer法による解析から、(*R*)-2,3-DihydroGGA ((*R*)-2,3-DiGGA) であることを明らかにした。

第2章 (*R*)-2,3-ジヒドロゲラニルゲラノイン酸の機能解析

第1節 胸腺細胞でのアポトーシス誘導

[方法]0-40 μ Mの(*R*)-2,3-DiGGAを胸腺細胞浮遊液に添加し、2時間後、ゲノムDNAの断片化、クロマチン凝縮を観察した。アポトーシス誘導の機構を解析するために、Diacylglycerol (DAG) 添加によるアポトーシス抑制効果、 $[^3H]$ Cholineを用いたPC生合成の阻害効果を調べた。

[結果](*R*)-2,3-DiGGA は、GGOH, GGAと同じく15 μ Mで誘導を示し、他の短鎖イソプレノイド化合物と同じくDAG添加によりアポトーシス抑制効果を示した。GGOHは、PC生合成系のCholine Phospho

Transferaseに対して競争阻害することでアポトーシスを誘導することが知られているが、(R)-2,3-DiGGAは、PC生合成系を阻害することはなかった。以上のことから、(R)-2,3-DiGGAによるアポトーシス誘導が、DAGの作用もしくは、代謝に関連していることを明らかにした。

第2節 細胞内レチノイン酸結合タンパク質 (CRABP) に対する結合活性

[方法]ラット精巣cDNAよりCRABPをCloningし、発現、精製を行った。蛍光法を用いて*all-trans*-Retinoic Acidの結合活性(Kd値)を求め、それに対する(R)-2,3-DiGGAの阻害効果からKd値を求めた。

[結果]*all-trans*-Retinoic AcidのKd値7.7 nMに対して15倍高いが118 nMで結合することを明らかにした。Phytenic AcidやPalmitic Acidには結合活性を示さないことから、選択性があることが明らかになった。また、(S)-2,3-DiGGAも結合活性を示したが、(R)-体との間に大きな差は見られなかった。

第3節 急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) を用いた分化誘導能の解析

[方法]5日間、GGA、(R)-2,3-DiGGA処理した細胞の数とNBT還元テストで染色された細胞をカウントすることにより、細胞増殖抑制効果と分化誘導能の比較を行った。

[結果]GGAは、濃度依存的に増殖抑制効果と共に分化誘導能を示した。一方、(R)-2,3-DiGGAは、分化誘導能を示さなかったが、増殖抑制と共に巨大顆粒の生成を確認した。

第4節 顆粒の生成とその組成の解析

[方法]巨大顆粒の選択性を調べるために、0-100 μ Mの(R)-2,3-DiGGA又はGGAを含むRPMI1640 (10% FBS) の中で細胞を培養した後、中性脂質特異的染色剤Nile Redで処理した細胞を蛍光顕微鏡で観察した。組成の確認は、Bligh-Dyer法により抽出した脂質をTLC及び酵素法により分析した。

[結果]20 μ M以上の(R)-2,3-DiGGAを含む培地でNile Red染色細胞が観察された。一方、GGAは、100 μ MでもNile Red染色細胞が観察されることはなかった。また、TLC分析よりこの中性脂質の組成はTriacylglycerolであり、Control細胞に比べ、38倍増加している事を確認した。

第5節 脂肪前駆細胞 (3T3-L1) を用いた分化誘導能の解析

[方法]3T3-L1細胞がConfluentになったことを確認後、80 μ M (R)-2,3-DiGGAを添加した培地で2日間培養した。その後、培地交換を行い、6日間培養した細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

[結果]油滴生成を誘導したことから、脂肪細胞への分化誘導能を持つことが明らかになった。

第6節 ペルオキシソーム増殖薬活性化レセプター γ 2 (PPAR γ 2)に対する結合活性

[方法]脂肪蓄積の主調節因子で、リガンド依存性転写因子でもあるPPAR γ 2のLigand Binding Domainの発現、精製を行い、蛍光法を用いて*cis*-Parinaric Acidの結合活性(Kd値)を求め、それに対する(R)-2,3-DiGGAの阻害効果からKd値を求めた。

[結果]PPAR γ 2の内在的Ligandとして知られている15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂のKd値47.6 nMに対して3.5倍高いが165 nMで結合することを明らかにした。

総括

GGOH下流代謝経路は、GGOH→GGA→(R)-2,3-DiGGAであることを明らかにした。また、2,3-DiGGAは、Refsum病患者の血清、尿中に大量に存在することが報告されており、本研究を含めて推測すると生体内で*de novo*合成されていることが示唆される。また、今回観察された油滴生成、アポトーシス誘導、脂肪細胞への分化誘導などの現象は、(R)-2,3-DiGGAがCRABPに結合することで核内に運搬され、PPAR γ 2に作用することにより下流遺伝子が活性化した結果ではないかと予想している。今後、(R)-2,3-DiGGAが内在的にどの程度存在するのか解析することが生理活性物質としての可能性を評価する上で重要である。

論文審査の結果の要旨

小平裕一君は、真核生物ゲラニルゲラニル化タンパク質合成上での脂質前駆体、ゲラニルゲラニル二リン酸(GGPP)、に焦点を当て、その異化代謝系を明らかにすることを目的に研究を行った。

第一章では、ラット胸腺細胞を用いてゲラニルゲラニール(GG-aldehyde)を前駆脂質とする未知代謝物の同定が述べられている。未知代謝物を多量に調製し、質量分析法によりおよその構造を推定した。その推定化合物を有機合成し質量分析することにより、その構造が2,3-ジヒドロゲラニルゲラノイン酸 (2,3-diGGA) であると同定した。この構造の3位の炭素の立体化学を証明するためにBINAPを用いる化学変換法を用いて更に研究を行い、それがR体であることも示した。この研究を踏まえ、ゲラニルゲラニオールを脂質前駆体とする代謝物も追求し、GG-aldehydeの場合と同様にR-2,3-diGGAを異化代謝物として検出している。

第二章では、一章で同定したR-2,3-diGGAに焦点を当て、この脂質分子がどのような機能をもつのかを調べている。(1) 0.1%血清下の胸腺細胞において15 μ M濃度 2時間でアポトーシスを誘導できる。この誘導はジアシルグリセロールにより抑制される。またこの誘導に関してはコリンからのPC 合成系の関与を否定している。(2) この脂質が転写因子RARとRXRのアゴニストとして機能せず、しかしCRABPには結合能を示すという論文を受け、発現させたラットCRABPでのこの脂質に対するKd値を111 nM と算出した。(3) 10%血清下HL-60細胞において 5 日間の培養で濃度依存的な細胞増殖の阻害を見出し、更に40 μ M以上の濃度において細胞内での顆粒生成を検出している。その顆粒には少なくともTAG 様の脂質が含有されていることも見出している。(4) 10%血清下3T3-L1細胞において80 μ M濃度で2日間この脂質を作用させ、その後脂質を除いて、6日間培養を行い、脂質顆粒の生成を認めている。(5) この脂質が少なくとも転写因子PPAR- γ 2に作用するのではないかと考え、発現させたヒトPPAR- γ 2-LBD タンパク質でのこの脂質に対するKd値を求めている。そのKd値を165 nMと算出している。

これらの研究により、GGPPからのR-2,3-ジヒドロゲラニルゲラノイン酸への異化代謝系の存在、またこの脂質が単なる異化代謝中間体ではなく、細胞増殖抑制作用をもち、アポトーシスや中性脂質形成といった現象に関連していることを証明した。

このように、高等生物でのGGPP異化代謝系に関する新事実が明らかにされ得たことは、小平裕一君が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、小平裕一君提出の論文は、博士(理学)の学位論文として合格と認める。